

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. Blobel

Kapselbildung bei Staphylococcus aureus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Dietrich Kitzrow
Tierarzt aus Oldersum

Gießen 1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545919_0038

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. Blobel

Kapselbildung bei Staphylococcus aureus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Dietrich Kitzrow
Tierarzt aus Oldersum

Gießen 1972

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
in Gießen

Dekan: Professor Dr. G. Lämmler

Berichterstatter: Professor Dr. H. Blobel

Tag der mündlichen Prüfung: 6./7. Juli 1972



Durchgeführt mit Unterstützung der
Deutschen Forschungsgemeinschaft

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1,0 Einleitung	1
2,0 Literaturübersicht	2
2,1 Vorkommen bekapselter Staphylokokken	2
2,2 Biologie und Pathogenität	2
2,3 Wachstum bekapselter Staphylokokken im Serum-Soft-Agar	4
2,4 Kapselquellung (Spezifische Kapselreaktion)	5
3,0 Material und Methoden	7
3,1 Material	7
3,11 Herkunft und Bezeichnung der Staphylokokkenkulturen	7
3,12 Feste Medien	8
3,13 Halbfeste Medien (Soft-Agar)	9
3,14 Flüssige Medien	9
3,15 Medium zum Nachweis der Mannit-spaltung	9
3,16 Medium für den Kristallviolett-test	10
3,17 Plasmagewinnung für den Koagulasenachweis	10
3,2 Methoden	10
3,21 Koagulasenachweis im Röhrchentest	10
3,22 Nachweis der Mannit-spaltung	11
3,23 Test auf Clumping Factor	11
3,24 Kristallviolettreaktion	12
3,25 Hämolyseachweis	12

	Seite
3,26 Herstellung von Antiseren	13
3,27 Mikroskopische Beobachtung bekapselter Staphylokokken	14
3,28 Züchtung bekapselter Staphylokokken im Serum-Soft-Agar	15
3,29 Quellungsreaktion (Spezifische Kapselreaktion)	16
4,0 Ergebnisse	17
4,1 Auswahl der in Frage kommenden Staphylokokkenkulturen	17
4,2 Biochemische Charakterisierung und Identifizierung	17
4,3 Darstellung bekapselter Staphylokokken	20
4,31 Makroskopische Beurteilung bekapselter Staphylokokkenkolonien	20
4,32 Mikroskopische Untersuchung bekapselter Staphylokokken	20
4,33 Wachstum bekapselter Staphylokokken im „normalen“ Serum-Soft-Agar	21
4,4 Serologische Differenzierung der bekapselten Staphylokokkenstämme	23
4,41 Kolonieförmigkeit in homologem und heterologem Serum-Soft-Agar	23
4,42 Quellungsreaktion (Spezifische Kapselreaktion)	25
5,0 Diskussion	29
6,0 Zusammenfassung	32
7,0 Literaturverzeichnis	33
Lebenslauf	

1,0 Einleitung

Kapselbildung kommt bei Staphylococcus aureus selten vor. Die Kapseln bestehen aus Polysacchariden und sind vermutlich für die starke Virulenz dieser Stämme verantwortlich (12,14). Es ist anzunehmen, daß sie die Phagozytose der Staphylokokken erschweren.

Über den Nachweis der Kapselsubstanz gab es zunächst viele Zweifel. GILBERT (11), OESTERLE (23) und HENRIKSEN (27) stützten ihre Beobachtungen auf morphologische Merkmale.

Als erste „definitive Methode, die Kapsel von S. aureus nachzuweisen“ (33), wurde die von PRICE und KNEELAND (26) angewendete Quellungsreaktion angesehen. MUDD (22) zweifelte jedoch die Zuverlässigkeit dieser Reaktion an und meinte, daß sie nur als „extrazelluläre, periphere Präzipitationsreaktion (EPPR)“ zu werten wäre.

FINKELSTEIN und SULKIN (10) und HUNT und MOSES (12) verwendeten den Serum-Soft-Agar. In diesem Medium bildeten bekapselte Staphylokokken diffuse Kolonien. Diese Beobachtung konnte von SHIMIZU, TAKIZAWA und SHIBATA (28) nicht wiederholt werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, eine zuverlässige Methode zum Nachweis der Kapsel bei S. aureus zu erarbeiten. Damit sollte eine Grundlage geschaffen werden für die weitere Analyse der Kapselsubstanz als mutmaßlichen Pathogenitätsfaktor.

2,0 Literaturübersicht

2,1 Vorkommen bekapselter Staphylokokken

GILBERT (11) berichtete 1931 über die Isolierung bekapselter Staphylokokken bei einem an ulcerativer Endocarditis verstorbenen Mann. Sie beschrieb die gleichen wesentlichen Merkmale solcher Staphylokokken wie CESTERLE (23) 1936 und HENRIKSEN (27) 1948 : Die Keime wuchsen auf gewöhnlichem Nährboden und produzierten weiß-gelbliche, glänzende, mehrere Millimeter große Kolonien von ausgesprochen schleimigem Aussehen. Mikroskopisch konnte die Kapsel in einer Tuschesuspension gut sichtbar gemacht werden.

Bei Untersuchungen von YOSHIDA und NAITO (35) über die Häufigkeit des Vorkommens bekapselter Staphylokokken waren von 875 S. aureus-Stämmen vom Menschen 37 (4,2%) bekapselt. Siebenundzwanzig Stämme wechselten allerdings nach 1 oder 2 Subkulturen von der bekapselten in die unbekapselte Form über.

2,2 Biologie und Pathogenität

GILBERT (11) isolierte gram-positive, hämolytische Kokken, die auf gewöhnlichem Nährboden wuchsen und Glukose, aber nicht Mannit, spalteten. Die Koagulasebildung prüfte sie nicht. CESTERLE (23) beschrieb die gleichen Eigenschaften bei den von ihm isolierten bekapselten Staphylokokken. Er konnte jedoch zusätzlich

feststellen, daß die Stämme koagulase-positiv waren. Andererseits fermentierten die von HENRIKSEN (27) isolierten Staphylokokken Glukose, Laktose, Mannit und waren starke Koagulasebildner, aber nicht hämolytisch. DUTHIE und HAUGHTON (6,7) beschrieben 2 Formen der Koagulase bei S. aureus: Die „freie“ Koagulase kam als Stoffwechselprodukt stets im Medium vor, die „gebundene“ dagegen war als „Clumping-Factor“ (CF) (18) Bestandteil der Bakterienzellwand. Weitere Untersuchungen von BLACKSTOCK, HYDE und KELLY (3) ergaben, daß koagulase-positive, bekapselte Staphylokokken negative CF-Reaktionen zeigten. Sie stellten zwar das Vorhandensein des CF fest, meinten aber, daß der CF wegen der Polysaccharidkapsel nicht nachgewiesen werden konnte.

Ein repräsentativer, bekapselter S. aureus-Stamm „Smith“, wurde von SMITH und DUBOS (29) und von KOENIG (13) beschrieben. Der „Smith“-Stamm spaltete Mannit und produzierte Koagulase und Hämolysin. HUNT und MOSES (12) wiesen außerdem eine starke Pathogenität des „Smith“-Stammes gegenüber Mäusen nach. Die LD_{50} war bei intraperitonealer Verabreichung von 4×10^6 vermehrungsfähigen Staphylokokken erreicht. Im Gegensatz dazu wurden mit unbekapselten Staphylokokken bei intraperitonealer Applikation selbst bei einer Dosis von 1×10^8 vermehrungsfähigen Staphylokokken die LD_{50} noch nicht erreicht. KOENIG, KELLY und

HOOGERS (14) prüften 5 bekapselte S. aureus-Stämme auf ihre Pathogenität gegenüber Mäusen. Bei intraperitonealen Injektionen von 2,8 bis $5,3 \times 10^8$ vermehrungsfähigen Staphylokokken starben 9 von 10 Mäusen innerhalb von 21 Stunden. Mit 3 unbekapselten Stämmen in der gleichen Dosis dagegen überlebten alle Mäuse den Beobachtungszeitraum von 28 Tagen. Dieselben Autoren versuchten den Pathogenitätsmechanismus lebender, bekapselter Staphylokokken nach intraperitonealen Injektionen in Mäuse zu analysieren (14,15). In der ersten Stunde nach der Infektion waren in der Peritonealflüssigkeit vorwiegend mononukleare Zellen zu finden, die die Staphylokokken nicht phagozytierten. Die Staphylokokken vermehrten sich sogar noch. In der zweiten Stunde traten polymorphkernige Leukozyten vermehrt auf, die zwar die Staphylokokken aufnahmen, aber die Vermehrungsrate der Staphylokokken nicht mehr wesentlich beeinflussen konnten.

2,3 Wachstum bekapselter Staphylokokken im Serum-Soft-agar

FINKELSTEIN und SULKIN (10) stellten in ihren Versuchen zur Differenzierung der Staphylokokken fest, dass koagulase-negative Staphylokokken im „normalen“ Serum-Soft-agar ebenso wie in einem einfachen Soft-agar diffuse Kolonien bildeten, während koagulase-positive Staphylokokken in Form kompakter Kolonien wuchsen. Sie schrieben

diese Tatsache einem „Colony Compacting Factor“ zu, der antikörperähnliche Eigenschaften haben sollte. ALAMI und KELLY (1) sahen einen Einfluß der „gebundenen Koagulase“ auf die Morphologie der Kolonien. Eine Ausnahme stellte der koagulase-positive, bekapselte S. aureus-Stamm „Smith“ dar, der diffus im „normalen“ Serum-Soft-Agar, jedoch kompakt im Soft-Agar mit homologem Antiserum wuchs. Die Bildung diffuser Kolonien im normalen Serum-Soft-Agar diente als eines der Identifizierungsmerkmale bekapselter S. aureus-Stämme (12,13,32,34). HUNT und MOSES (12) sahen einen Zusammenhang zwischen dem diffusen Wachstum und der hohen Mausepathogenität bekapselter Staphylokokken, die WILEY und MAVERAKIS (32) auf das Fehlen natürlicher Antikörper im Normalserum gegenüber Kapselsubstanzen zurückführte. SHIMIZU, TAKIZAWA und SHIBATA (28) untersuchten 281 S. aureus-Stämme im Serum-Soft-Agar und unterschieden 4 Kolonieformen: „kompakt“, „kompaktähnlich“, „intermediär“ und „diffus“. Diffuses Wachstum zeigten alle Stämme nur im gewöhnlichen Soft-Agar. Im Serum-Soft-Agar dagegen bildeten sie kompaktes oder kompaktähnliches Wachstum. Nur der „Smith“-Stamm wuchs in Kolonien, die sie mit „intermediär“ bezeichneten.

2,4 Kapselquellung (Spezifische Kapselreaktion)

PRICE und KNEELAND (25) gelang es, eine Quellungsreaktion des bekapselten S. aureus-Stammes „RL mucoid“ mit homologem Antiserum

nachzuweisen. In einer weiteren Arbeit stellten sie fest, daß es keine spezifische Reaktion auf die Kapselsubstanz von „RL mucoid“ war, da von 39 anderen isolierten Staphylokokkenstämmen 32 ebenfalls eine Art Quellungsreaktion bei Verwendung des „RL mucoid“-Antiserums zeigten. WILLY (32) lehnte die Bezeichnung „Quellungsreaktion“ ab und nannte die Reaktion nach TOMCSIK (30) „spezifische Kapselreaktion“, da keine echte Anschwellung der Kapsel erkennbar war. GILBERT (11) und KÖHNIG (15) konnten ebenfalls keine Quellungsreaktion demonstrieren. WILLY dagegen wies an dem von ihm isolierten S. aureus-Stamm „wound mucoid“ die Bekapselung mit der Quellungsreaktion nach. Er meinte, daß diese Reaktion „definitiv“ zum Kapselnachweis geeignet wäre. HODD (22) bestreitet die Bekapselung der von PRICE und KNEELAND und von WILLY isolierten Stämme und den Wert der Quellungsreaktion als Nachweismethode für die Bekapselung.

3,0 Material und Methoden

3,1 Material

3,11 Herkunft und Bezeichnung der Staphylokokkenkulturen

Als Untersuchungsmaterial dienten 20 Staphylokokkenkulturen. Davon waren 10 vom Menschen, 5 vom Rind und 5 vom Hund.

Tabelle 1

Herkunft und Bezeichnung der untersuchten
Staphylokokkenkulturen

<u>Herkunft</u>	<u>Bezeichnung</u>
<u>vom Menschen:</u>	
K. Yoshida, Nippon Medical School, Tokio, Japan	YT6 D Smith Diffuse Koenig Smith Diffuse OSU
B. Wiley, University of Utah, USA	36 T 43 R
R. Blackstock, Department of Micro- biology, University of Oklahoma, USA	Smith Diffuse K 93
National Collection of Type Cultures, London, England	M 10649

Fortsetzung von Tabelle 1

<u>Herkunft</u>	<u>Bezeichnung</u>
Von 179 Staphylokokkenkulturen aus Untersuchungsmaterial der humanmedizinischen Kliniken der Justus-Liebig Universität, Gießen	M 52 M 152
<u>von Kind:</u>	
Von 200 Staphylokokkenkulturen aus Milchproben	R 1277 R 1414 R 1415 R 1532 R 1609
<u>von Hund:</u>	
Von 244 Staphylokokkenkulturen aus dem Untersuchungsmaterial der Veterinärkliniken der Justus-Liebig Universität, Gießen	H 29 H 100 H 160 H 170 H 268

3,12 Feste Medien

Zur Züchtung von Staphylokokken wurde Nutrient-Agar¹⁾ benutzt und nach den Angaben der Herstellerfirma zubereitet.

¹⁾ Difco Laboratories, Detroit, USA

Zur Herstellung des Blutagars wurden zu 9 Vol. Nutrient-Agar¹⁾ 1 Vol. defibriniertes Schafblut bei 52°C zugesetzt.

3,13 Halbfeste Medien (Soft-Agar)

Als Grundlage zur Herstellung halbfester Medien diente Brain-Heart-Infusion¹⁾, dem 0,15% Agar¹⁾ hinzugefügt wurde.

Zur Herstellung von Serum-Soft-Agar wurde das Medium im Dampftopf aufgelöst, im Wasserbad auf 56°C abgekühlt und 1% steriles Kaninchenserum hinzugefügt.

3,14 Flüssige Medien

Es wurde Trypticase-Soy-Broth¹⁾ verwendet. Je 20 ml dieser Bouillon wurden in 100 ml-Kolben abgefüllt und 15 Min. bei 120°C autoklaviert.

3,15 Medium zum Nachweis der Mannitspaltung

Mannit-Agar-Platten wurden aus 8,0 g Nutrient-Broth¹⁾, 10,0 g D-Mannit²⁾, 3,0 g Kochsalz und 20,0 g Nutrient-Agar¹⁾ in 1 000 ml Aqua dest. hergestellt. Nach dem Autoklavieren wurde eine 1,5%ige alkoholische Bromthymolblau-Lösung hinzugefügt bis zu einer Endkonzentration von 0,5%.

1) Difco Laboratories, Detroit, USA

2) E. Merck AG, Darmstadt

3,16 Medium für den Kristallvioletttest

Nutrient-Agar¹⁾ diente als Grundmedium. Nach 15 Min. autoklavieren bei 120°C wurde der Agar im Wasserbad auf 56°C abgekühlt und eine 1%ige Kristallviolett-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 : 100 000 hinzugefügt.

3,17 Plasmagewinnung für den Koagulasenachweis

Einem ca. 2,5 kg schweren Kaninchen wurde durch Herzpunktion Blut entnommen. Das Blut wurde mit Natriumcitrat versetzt (0,2 ml einer 3,9%igen Natriumcitratlösung zu 0,8 ml Blut). Das Citratblut wurde bei 2 000 x g 20 Min. zentrifugiert²⁾ und das Plasma abpipettiert. Das Plasma wurde bis zum Verbrauch bei -18°C aufbewahrt.

3,2 Methoden

3,21 Koagulasenachweis im Röhrchentest

Der Koagulasenachweis wurde nach der Methode von YOSHIDA, SMITH und NAITO (35) durchgeführt.

¹⁾ Difco Laboratories, Detroit, USA

²⁾ Stock-Zentrifuge, W. Stock, Maschinenbau, Marburg

Zu 0,5 ml 1 : 5 verdünnten Kaninchenplasmas wurde 1 Öse einer 18 Std. bei 37°C bebrüteten Staphylokokken-Bouillonkultur (TSB¹⁾) gegeben und bei 37°C bebrütet. Nach 1, 2, 4 und 18 Std. wurde die Koagulasereaktion abgelesen.

3,22 Nachweis der Mannitspaltung

Die einzelnen Staphylokokkenkulturen wurden auf Mannitagarplatten ausgestrichen und 24 Std. unter anaeroben Verhältnissen bei 37°C bebrütet (28). Bei positiver Reaktion wurde der Indikator gelb.

3,23 Test auf Clumping Factor (CF)

Der CF wurde im wesentlichen nach der Methode von DUTHIE (8) nachgewiesen. 50 µl tannisierter Erythrozyten vom Schaf wurden mit Rinderfibrinogen²⁾ konjugiert. Auf einer Tüpfelplatte wurden sie mit einer Suspension aus 1 Öse Staphylokokken und 50 µl phys. Kochsalzlösung vermischt. Nach 30 Sek. zeigte sich bei positiver Reaktion eine Verklumpung der Bakterien mit den Erythrozyten. Kontrollreaktionen wurden durchgeführt mit einer Suspension aus 1 Öse Staphylokokken und 50 µl tannisierter Erythrozyten sowie aus 1 Öse Staphylokokken und 50 µl phys. Kochsalzlösung, um Eigenagglutinationen auszuschalten.

1) Difco Laboratories, Detroit, USA

2) The British Drug Homes Ltd., Poole, England

3,24 Kristallviolettreaktion

Es wurde das Beurteilungsschema und die Untersuchungstechnik von MEYER (21) angewendet. Auf die Kristallviolettplatten wurden verschiedene Staphylokokkenkulturen in Tupfeln mit einem Durchmesser von ca. 6 mm aufgetragen. Nach einer Bebrütungsdauer von 24 Std. wurde der Farbumschlag der Kolonien ausgewertet. (Tab. 2)

Tabelle 2

Beurteilungsschema der Kristallviolettreaktionen nach MEYER

Farben	Kristallviolettgruppen	Herkunft
gelb-gelbblau	A	Rind
violett-blau	C	Mensch
weiß-blauweiß	E	Hund

3,25 Hämolysinnachweis

Der Nachweis spezifischer Hämolysine wurde mit dem Dreiersatz nach MASSSEN und WULKOW (19) durchgeführt.

Die Herstellung von Blutplatten erfolgte jeweils mit 5% Schaf-, Menschen- und Kaninchenerythrozyten, die zuvor dreimal mit phys. Kochsalzlösung gewaschen worden waren. Je 1 dieser 3 Platten wurde mit dem entsprechenden Stamm inokuliert, 24 Std. bei 37°C bebrütet und abgelesen (19).

3,26 Herstellung von Antiseren

Achtzehn Std. bei 37°C bebrütete Staphylokokkenkulturen wurden in phys. Kochsalzlösung suspendiert und mit einem Photometer¹⁾ bei 600 nm über eine Eichkurve auf eine Dichte von 10^9 Staphylokokken/ml eingestellt. Zur Inaktivierung der Staphylokokken wurde die Suspension mit 0,4% Formalin versetzt und 12 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Abtötung der Staphylokokken wurde auf Blutagar geprüft. Die Immunisierung erfolgte in Anlehnung an die Beschreibung von KRETSCHMAR (16). Im einzelnen wurden 2,5 - 3,0 kg schweren Kaninchen in 3 Serien, jeweils an 3 aufeinanderfolgenden Tagen, intravenöse Injektionen der Staphylokokken verabreicht. Zwischen jeder Serie lag ein Zwischenraum von 5 Tagen.

¹⁾ Photometer „Spectronic 20“, Bausch & Lomb GmbH, Frankfurt/Main

<u>1. Injektionsserie</u>	<u>2. Injektionsserie</u>	<u>3. Injektionsserie</u>
0,1 ml	0,4 ml	0,8 ml
0,2 ml	0,6 ml	1,0 ml
0,4 ml	0,8 ml	1,0 ml

Fünf Tage nach der letzten Injektion wurde der Agglutinationstiter mit den homologen Staphylokokken bestimmt. Bei einem Titer von mehr als 1 : 1 000 wurden die Kaninchen durch Herzpunktion entblutet. Das Blut wurde 6 Std. bei Zimmertemperatur und weitere 12 Std. bei +4°C aufbewahrt. Dann wurde es zentrifugiert¹⁾. Das Serum wurde abpipettiert und bei -18°C aufbewahrt.

3,2/ Mikroskopische Beobachtung bekapselter Staphylokokken

Zur mikroskopischen Darstellung bekapselter Staphylokokken wurde auf einen Objektträger ein Tropfen Tusche²⁾ gebracht. In die Tusche wurden einige Staphylokokken vermischt und mit dem Deckglas abgedeckt. Um einzelne Staphylokokken erkennen zu können, mußte das Deckglas fest angepresst werden, um die Staphylokokken zu „fixieren“. Anschließend wurde das Präparat unter Ölimmersion bei 1 200facher Vergrößerung betrachtet³⁾. Das Objektiv mußte so

1) Stock, Zentrifuge, W. Stock, Maschinenbau, Harburg

2) India Ink 21 A 243, Pelikan

3) Standardmikroskop RA, Objektiv Plan 100/1,3 Öl
Carl Zeiß, Oberkochen

fokussiert werden, daß die Kapsel als weißer Ring um den dunklen Zelleib erkennbar war. (5,17) Die Staphylokokken wurden mit einem Fotomikroskop fotografiert. Die Belichtung betrug 15 Sek. bei Blende 14¹⁾.

3,28 Züchtung bekapselter Staphylokokken im Serum-Soft-Agar

Achtzehn Std. bebrütete Staphylokokkenkulturen wurden in phys. Kochsalzlösung suspendiert, mit einem Photometer²⁾ über eine Eichkurve auf 10^9 Staphylokokken/ml bei 600 nm eingestellt und dann auf 10^3 Staphylokokken/ml verdünnt. Im Reagenzglas wurde 10 ml Serum-Soft-Agar, der je nach Versuchsanordnung 1% Normalserum, homologes oder heterologes Antiserum enthielt, mit 0,02 - 0,03 ml der Staphylokokkensuspension inokuliert und bei 37°C bebrütet. Um eine diffuse oder kompakte Kolonieförmigkeit exakt erkennen zu können, mußte die Beurteilung des Wachstums nach 12 - 14 Std. erfolgen (10).

1) Fotomikroskop, Carl Zeiß, Oberkochen
Papier Agfa BH 1

2) Photometer "Spectronic 20", Bausch & Lomb
GmbH, Frankfurt/Main

3,29 Quellungsreaktion (spezifische kapselreaktion)

Auf einen Objektträger wurden 2 Tropfen Antiserum gebracht und mit 1 Ose einer 3 - 6 Std. bebrüteten Staphylokokken-Bouillon des homologen oder eines heterologen Stammes gründlich vermischt. Als Kontrastfarbstoff wurde 1 Tropfen einer wässrigen Methylenblaulösung hinzugefügt. Diese Suspension wurde dann mit einem vaselineumrandeten Deckglas abgedeckt. Nach 3 Std. erfolgte die mikroskopische Beurteilung der Reaktion unter Glimmerion (31,32).

4,0 Ergebnisse

4,1 Auswahl der in Frage kommenden Staphylokokkenkulturen

Es wurden zunächst 179 Staphylokokkenkulturen vom Menschen, 200 vom Rind und 244 vom Hund auf Kapselbildung geprüft. Als Kriterien wurden eine mikroskopisch sichtbare Kapsel und die Bildung schleimiger Kolonien auf Blutagar angesehen. Von diesen Kulturen erschienen 2 vom Menschen, 5 vom Rind und 5 vom Hund als potentielle Kapselbildner. Zusammen mit den 8 von anderen Autoren zur Verfügung gestellten Referenzstämmen vom Menschen (Tab.1) wurden insgesamt 20 Staphylokokkenkulturen auf Kapselbildung näher untersucht.

4,2 Biochemische Charakterisierung und Identifizierung

Zur Identifizierung als S. aureus wurden die 20 Staphylokokkenkulturen auf Koagulasebildung und Mannitspaltung geprüft. Die 10 Kulturen vom Menschen und die 5 vom Rind waren S. aureus (4). Die 5 Staphylokokkenkulturen vom Hund spalteten zwar mit einer Ausnahme Mannit, waren dagegen aber koagulase-negativ. Demzufolge konnten sie nicht als typische S. aureus - Kulturen angesehen werden. Alle 20 Staphylokokkenkulturen waren hämolytisch und mit Ausnahme der Kulturen vom Rind CF-

negativ. Wie Prüfung auf Kristallvioletttagar
ergab, daß die Einordnung in die Kristallvio-
lettgruppen mit der Herkunft der kulturen
übereinstimmte. (Tab. 3)

Tabelle 3

Biochemische Charakterisierung und Identifizierung
der untersuchten Staphylokokkenkulturen

Herkunft und Bezeichnung der Kulturen		K/CF ¹⁾	Mannit- spaltung	Hämolyse	Kristallvio- lettgruppe
Mensch	M 10649	+/-	+	β	C
	YTB D	+/-	+	α	C
	56 T	+/-	+	β	C
	43 K	+/-	+	α	C
	SV	+/-	+	$\alpha\delta$	C
	sd Koenig	+/-	+	$\alpha\delta$	C
	sd OSL	+/-	+	$\alpha\delta$	C
	K 95	+/-	+	β	C
	M 152	+/-	+	α	C
	M 52	+/-	+	β	C

Fortsetzung von Tabelle 3

Herkunft und Bezeichnung der kulturen		K/CF ¹⁾	Mannit- spaltung	Hämolysine	kristallvio- lettgruppen
Rind	R 1277	+/+	+	$\alpha\beta$	A
	R 1414	+/+	+	$\alpha\beta$	A
	R 1415	+/+	+	$\alpha\beta$	A
	R 1532	+/+	+	$\alpha\beta$	A
	R 1609	+/+	+	$\alpha\beta$	A
Hund	H 268	-/-	+	$\alpha\beta$	E
	h 170	-/-	+	$\alpha\beta$	E
	h 160	-/-	+	α	E
	h 29	-/-	+	α	E
	h 100	-/-	-	$\alpha\beta$	E

¹⁾K/CF = freie Koagulase/Clumping Factor

4,3 Darstellung bekapselter Staphylokokken

4,31 Makroskopische Beurteilung bekapselter Staphylokokkenkolonien

Die Bildung einer Kapsel zeigte sich weitgehend schon bei makroskopischer Betrachtung der Kolonien. Nach 18 Std. bei 37°C bildeten stark bekapselte Stämme auf Blutagar schleimig-glänzende, weiß-gelbliche Kolonien von 2 - 3 mm Durchmesser. Nach einer weiteren Bebrütung von 24 - 28 Std. flossen die Kolonien bis auf 5 mm Durchmesser auseinander (Abb.1). Ein besonders deutliches mukoides Wachstum (++) wurde nur bei den Stämmen M 10649, M 52, M 152 und K 93 beobachtet (Tab.4).

4,32 Mikroskopische Untersuchung bekapselter Staphylokokken

Zur mikroskopischen Beobachtung kapselbildender Staphylokokken wurde eine Tusche - Keim - Suspension hergestellt und unmittelbar danach zwischen Objektträger und Deckglas unter Ölimmersion untersucht. Der schwarze Zelleib und die ihn ringförmig umgebende helle Kapselzone hoben sich deutlich von dem schwarz-grau erscheinenden TuschenemEDIUM ab (Abb.2).

Mit einem in das Okular eingesetzten Mikrometer¹⁾ wurde die Dicke der Kapsel gemessen.

¹⁾ Okularmikrometer, Carl Zeiss, Oberkochen

Sie betrug bei den einzelnen Stämmen 0,8 - 1,0 μ m. Die stärkste Bekapselung bei mikroskopischer Betrachtung hatten die Stämme, die auch stark schleimige Kolonien auf Blutagar bildeten: M 10649, M 52 und M 152. (Tab.4)

Die von SCOTT (22) angegebene Methode, vor der Suspendierung in Tusche die Zellen mit einer 2%igen Bengalrosalösung anzufärben, erwies sich nicht als vorteilhaft.

4,33 Wachstum bekapselter Staphylokokken in „normalem“ Serum-Soft-Agar

Zur weiteren Identifizierung wurden einige Zellen der zur Verfügung stehenden Staphylokokkenstämme in „normalem“ Serum-Soft-Agar 12 - 14 Std. bei 37°C bebrütet. An Hand der Kolonieförmigen wurde vergleichend diffuses und kompaktes Wachstum beobachtet (Abb.3). Die diffus wachsenden Stämme vom Menschen und Hund bildeten 1 - 2 cm lange, fädige, die kompakten Stämme vom Rind 1 - 2 mm dicke, punktförmige Kolonien. (Tab.4)

Wichtig war die genaue Einhaltung der Bebrütungsdauer. Betrug sie länger als 18 Std., konnte nicht mehr eindeutig zwischen diffusum und kompaktem Wachstum unterschieden werden.

Tabelle 4

Zusammenfassung der Ergebnisse zur Darstellung
bekapselter Staphylokokken

Stämme	Mukoides ¹⁾ Wachstum auf Blutagar	Mikroskop. ¹⁾ Nachweis der Kapseln	Kolonieformen ²⁾ im Serum-Soft- Agar
M 10649	++	++	D
YT6 D	++	++	D
36 T	+	++	D
43 R	+	++	D
Sv	+	++	D
Sd Koenig	+	++	D
Sd OSU	+	++	D
K 93	++	++	D
M 152	++	++	D
M 52	++	++	D
R 1277	-	+	C
R 1414	-	+	C
R 1415	-	+	C
R 1532	-	+	C
R 1609	-	+	C
H 268	+	+	D
H 170	-	+	D
H 160	+	+	D
H 29	-	+	D
H 100	-	+	D

1) ++ = stark, + = schwach, - = nicht

2) D = diffus, C = kompakt

4,4 Serologische Differenzierung der bekapselten
Staphylokokkenstämme

4,41 Kolonieförmigkeiten in homologem und heterologem
Serum-Soft-Agar

Alle im „normalen“ Serum-Soft-Agar diffus wachsende Staphylokokkenstämme vom Menschen und Hund bildeten mit ihren homologen Antisera kompakte Kolonien, mit heterologen Antisera wuchsen sie jedoch weiter diffus (Abb.4). Eine vollständige Kreuzreaktion wurde bei den Stämmen K 93 und Sd Koenig beobachtet. Unvollständige Kreuzreaktionen bildeten die Stämme K 93, Sd Koenig und die Stämme vom Hund mit Ausnahme von H 100. (Tab. 5)

Die Bildung kompakter Kolonien bekapselter S. aureus-Stämme in Gegenwart von homologen Antisera im Soft-Agar deutete auf das Vorhandensein von Kapselantigenen hin.

Tabelle 5

Kolonieformen bei Wachstum der Staphylokokken im
Serum-Soft-Agar mit homologen und heterologen
Antisera

Antiseren Stämme	M 10649	YT6 D	36 T	43 R	Sv	Sd Koenig	Sd OSU	K 93	M 152	M 52	H 268	H 170
M 10649	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YT 6 D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36 T	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43 R	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sv	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Sd Koenig	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Sd OSU	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
K 93	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
M 152	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M 52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
H 268	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
H 170	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
H 160	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
H 29	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
H 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = kompakte Kolonien

- = diffuse Kolonien

4,42 Quellungsreaktion (Spezifische Kapselreaktion)

Als Quellungsreaktion wurde nur ein deutliches Sichtbarwerden der Kapsel in dem aus wässriger Methylenblaulösung bestehenden Kontrastmedium gewertet. Bei dieser Reaktion wurden die dunkelblau angefärbten Zellen durch eine ungefarbte Zone, der Kapsel, weiter auseinandergedrängt als es im Tuschepräparat sichtbar war. (Abb.3)

Alle bekapselten S. aureus- Stämme vom Menschen reagierten nach 3 Std. mit den homologen Antiseren positiv. Mit den heterologen Antiseren war ebenso wie bei den Stämmen vom Hund eine Quellungsreaktion nicht eindeutig zu identifizieren. Zwischen den Stämmen K 93 und 3d Koenig gab es eine vollständige Kreuzreaktion wie im Serum-Soft-Agar-Versuch.

Tabelle 6

Quellungsreaktionen der bekapselten Staphylokokken
mit homologen und heterologen Antiseren

Antiseren Stämme	M 10649	YT6 D	36 T	43 R	Sv	Sd Koenig	Sd OSU	K 93	M 152	M 52	H 268	H 170
M 10649	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YT6 D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36 T	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43 R	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sv	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Sd Koenig	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Sd OSU	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
K 93	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
M 152	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M 52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
H 268	-	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)
H 170	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)
H 160	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-
H 29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)
H 100	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-

+ = deutlich, (+) = fraglich, - = negativ

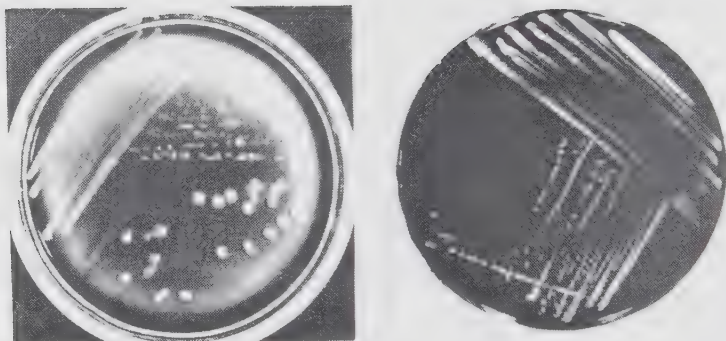


Abb. 1 Blutagarkulturen nach 24 Std. bebrütungsdauer bei 37°C. Links der bekapselte Stamm M 152, rechts der unbekapselte Stamm R 1277.

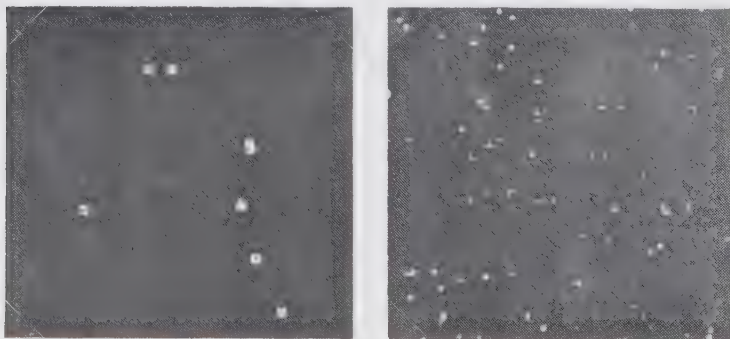


Abb. 2 Der bekapselte Stamm M 152 (links) und der unbekapselte Stamm R 1277 (rechts) im Tuschepräparat bei 1000facher Vergrößerung.

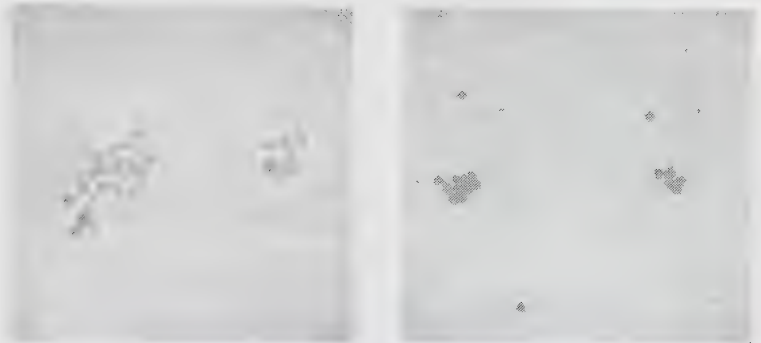


Abb. 3 Quellungsreaktion. Links positive Reaktion des Stammes M 10649 mit homologem Antiserum, rechts negative Reaktion mit heterologem Antiserum.

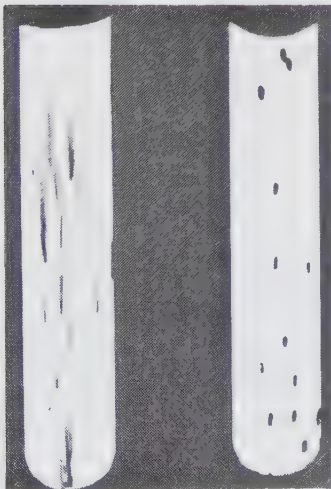


Abb. 4 Koloniebildung im Serum-Soft-Agar. Links Stamm M 10649 mit heterologem Antiserum (diffuse Kolonien) und rechts mit homologem Antiserum (kompakte Kolonien).

5,0 Diskussion

Die Kapsel von S. aureus war in der Vergangenheit nicht eindeutig zu identifizieren (11,23).

Bei diesen Untersuchungen wurden als Kriterien zur Auswahl potentieller Kapselbildner aus 623 Staphylokokkenkulturen zunächst die Bildung schleimiger Kolonien auf Blutagar und mikroskopisch sichtbarer Kapseln beobachtet. Diese Methoden erwiesen sich jedoch nicht als ausreichend, da mit ihnen zwischen echter Bekapselung und „Pseudobekapselung“ nicht klar unterschieden werden konnte. Allerdings bildeten Staphylokokken mit starker Bekapselung ebenfalls stark schleimige Kolonien.

Die CF-Reaktion erwies sich andererseits als brauchbares Identifizierungsmerkmal. Die Untersuchungen von BLACKSTOCK, HYDE und KELLY (3) und ALAMI, KELLY und RACE (2) über CF-Reaktionen bei bekapselten Staphylokokken stimmten mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Nur bekapselte S. aureus-Stämme hatten eine K^+/CF^- - Reaktion.

Die Bildung diffuser Kolonien im normalen Serum-Soft-Agar als Eigenschaft bekapselter Staphylokokken kann nur in Verbindung mit einer positiven Koagulasereaktion beurteilt werden. Die Tatsache, daß koagulase-positive Staphylokokken im normalen Serum kompakte,

koagulase-negative jedoch diffuse Kolonien bildeten, schrieben FINKELSTEIN und SULKIN (10) einem „Colony Compacting Factor“ zu, der „ähnliche Eigenschaften wie Antikörper“ haben sollte. Dieser Faktor kam jedoch bei koagulase-positiven, bekapselten Staphylokokken nicht zur Wirkung. Das diffuse Wachstum koagulase-positiver Staphylokokken wurde als charakteristische Reaktion auf die Bekapselung gewertet und ließ sich nicht mit der gleichen Erscheinung koagulase-negativer vergleichen.

SHIMIZU, TAKIZAWA und SHIBATA (28) unterschieden die Morphologie der Kolonien in 4 Typen. Diffuse Kolonien bildeten Staphylokokken nur in einfachem Soft-Agar-Medium. Das Wachstum des bekapselten „Smith“-Stammes bezeichneten sie mit „intermediär“. Das widersprach jedoch den Ergebnissen anderer Autoren (10, 13, 32, 34). Auch in dieser Arbeit konnte bei dem „Smith“-Stamm ebenso wie bei anderen bekapselten S. aureus-Stämmen im Serum-Soft-Agar nur diffuses Wachstum beobachtet werden.

Die serologische Differenzierung der Teststämmen wurde mit Antiseren im Soft-Agar-Medium durchgeführt. Das kompakte Wachstum als Antigen-Antikörperreaktion wurde auch bei den unbekapselten Hundestämmen beobachtet. Als einzige Stämme serologischer Identität bildeten K 93 und

3d Koenig eine vollständige Kreuzreaktion. Andere unvollständige Kreuzreaktionen der Stämme K 93 und 3d Koenig sowie der Mundestämme bezeichnete WILEY und MAVERAKIS (20) als „one way reaction“, ähnlich den Reaktionen, die PEASE und LAUGHTON (24) bei Mycoplasmaantigenen beobachteten.

Über den Wert der Kapselquellung als Darstellungsmethode der Kapsel bestanden in der Literatur widersprüchliche Angaben. Die für GILBERT (11) und KOENIG (13) nicht reproduzierbare Reaktion bezeichnete MUDD (22) als „EPPR“. Bei diesen Versuchen konnte jedoch ein Anschwellen der bekapselten Staphylokokken demonstriert werden, wie sie den Beobachtungen von WILEY (32) entsprachen. Allerdings wurden unter Berücksichtigung der Arbeit von PRICE und KNEELAND (25) nur deutlich sichtbare Reaktionen als positiv bewertet.

Die starke Pathogenität bekapselter Staphylokokken gegenüber Mäusen wurde in dieser Arbeit experimentell nicht näher geprüft. Sie könnte als weiteres Identifizierungsmerkmal in Frage kommen.

Aus den Untersuchungen ging hervor, daß erst die Kombination mehrerer Nachweismethoden zuverlässigen Aufschluß über die Bekapselung bei S. aureus geben konnte.

6,0 Zusammenfassung

Zum Nachweis der Kapsel bei S. aureus wurden als Kriterien die Bildung schleimiger Kolonien auf Blutagar, die mikroskopisch sichtbare Kapsel, die Clumping Factor- (CF-) Reaktion, die Soft-Agar-Methode und die Quellungsreaktion herangezogen.

179 Kulturen vom Menschen, 200 Kulturen vom Rind und 244 Kulturen vom Hund wurden zunächst auf die Bildung schleimiger Kolonien und mikroskopisch sichtbarer Kapseln untersucht. Zwei Kulturen vom Menschen, 5 vom Rind und 5 vom Hund wurden damit als potentielle Kapselbildner ausgewählt. Zusätzlich wurden 8 bekapselte S. aureus - Referenzstämme vom Menschen in die Untersuchungen einbezogen. Nach weiterer eingehender Prüfung zusätzlich mit der CF-Reaktion, der Serum-Soft-Agar-Methode und der Quellungsreaktion konnte bei den Stämmen vom Menschen eindeutig eine Kapsel nachgewiesen werden. Alle 10 Stämme wurden durch die Koagulasebildung und Mannitspaltung als S. aureus identifiziert und waren CF-negativ. Mit homologen Antiseren wuchsen sie im Soft-Agar als kompakte Kolonien, nicht dagegen mit den heterologen Antiseren und mit „normalem“ Serum. Vollständige Kreuzreaktionen wurden bei 2 Stämmen beobachtet. Ebenso wurde eine deutliche Quellungsreaktion nur mit homologen, nicht aber mit heterologen Antiseren festgestellt. Auch hier ergaben sich Kreuzreaktionen bei den gleichen 2 Stämmen.

7,0 Literaturverzeichnis

1. ALAMI, S.Y.
KELLY, F.C.
Demonstration of staphylococcal clumping factor and free coagulase in soft agar media.
J. Bact. 78, 539-544 (1959)
2. ALAMI, S.Y.
KELLY, F.C.
RACE, G.J.
Pathogenicity of staphylococci
J. Bact. 53, 577-589 (1968)
3. BLACKSTOCK, R.
HYDE, R.
KELLY, F.C.
Inhibition of fibrinogen reaction by polysaccharide of encapsulated Staphylococcus aureus.
J. Bact. 96, 799-803 (1968)
4. BREED, R.S.
MURRAY, E.G.S.
SMITH, N.R.
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
7. Aufl.
The Williams & Wilkins Comp.
Baltimore, USA (1957)
5. DUGUID, J.P.
The demonstration of bacterial capsules and slime.
J. Path. Bact. 63, 673-685 (1951)
6. DUTHIE, E.S.
HAUGHTON, G.
Purification of the staphylococcal coagulase.
Biochem. J. 70, 125-134 (1958)

7. DUTHIE, E.S. Evidence for two forms of staphylococcal coagulase.
J. Gen. Microbiol. 10, 427-436 (1954)
8. DUTHIE, E.S. The action of fibrinogen on certain pathogenic cocci.
J. Gen. Microbiol. 13, 385-393 (1955)
9. ELEK, S.D. Distribution of haemolysin in pathogenic staphylococci.
J. Path. Bact. 62, 541-554 (1950)
10. FINKELSTEIN, R.A. Characteristics of coagulase positive and coagulase negative staphylococci in serum soft agar.
SULKIN, S.E. J. Bact. 75, 339-344 (1958)
11. GILBERT, I. Dissociation in an encapsulated staphylococcus.
J. Bact. 21, 157-160 (1931)
12. HUNT, G.A. Acute infection of mice with
MOSES, A.J. Smith strain of Staphylococcus aureus.
Science, 128, 1574-1575 (1958)
13. KOENIG, M.G. Factors relating to the virulence of staphylococci.
I. Comparative studies on two colonial variants.
Yale J. Biol. Med. 34, 537-559 (1962)

14. KOENIG, M.G.
MELLY, M.A.
ROGERS, D.E. Factors relating to the virulence of staphylococci.
II. Observations on four mouse-pathogenic strains.
J. Exp. Med. 116, 589-599 (1962)
15. KOENIG, M.G.
MELLY, M.A.
ROGERS, D.E. Factors relating to the virulence of staphylococci.
III. Antibacterial versus antitoxic immunity.
J. Exp. Med. 116, 601-610 (1962)
16. KRETSCHMAR, W. Die modifizierte Technik der Staphylokokken-Agglutination.
Zbl. Bakt., Abt. I, Orig. 204, 325-334 (1967)
17. LENHART, N.A.
LI, I.W.
DECOURCY, S.J. Nonmucoid mutant of the encapsulated Smith strain of Staphylococcus aureus.
J. Bact. 83, 1165-1166 (1962)
18. LIPINSKI, B.
HAWIGER, J.
JELJAZEWICZ, J. Staphylococcal clumping with soluble fibrin monomer complexes.
J. Exp. Med. 126, 979 (1967)
19. MAASSEN, W.
WULKOW, R. Zur Biologie und Resistenz pathogener Staphylokokken unter besonderer Berücksichtigung der hämolytischen Toxine bei verschiedenen Erkrankungen.
Zbl. Bakt. Abt. I, Orig. 208, 161-169 (1968)

20. MAVERAKIS, N.E.
WILLY, B.B. Evidence for a multiplicity of capsular types among Staphylococcus aureus strains. J. Bact. 99, 472-479 (1969)
21. MEYER, W. Über die Brauchbarkeit des kristallviolett-Testes zur Differenzierung von Staphylococcus aureus-Stämmen. Z. Hyg. Inf. krh. 153, 158-168 (1967)
22. MUDD, S. Capsulation, pseudocapsulation and the somatic antigens of the surface of Staphylococcus aureus. Ann. N.Y. Acad. Sci. 128, 45-58 (1965)
23. OESTERLE, P. Die Verschleimung des Staphylococcus pyogenes aureus. Zbl. Bakt. Abt. 1, Orig. 163, 221-227 (1956)
24. PRASE, P.
LUGGTON, N. The antigenic structure of Haemophilus and Corynebacterium species and human genital tract claimed to be associated with or derived from Mycoplasma hominis. J. Gen. Microbiol. 41, 293-297 (1965)

25. PRICE, K.M.
KNEELAND, Y. A mucoid form of Micrococcus pyogenes var. aureus which shows capsular swelling with specific immune serum.
J. Bact. 67, 472-475 (1954)
26. PRICE, K.M.
KNEELAND, Y. Further studies of the phenomenon of capsular swelling of Micrococcus pyogenes var. aureus in the presence of immune serum.
J. Bact. 71, 229-230 (1956)
27. SCOTT, A.C. A capsulate Staphylococcus aureus.
J. Med. Microbiol. 2, 235-260 (1969)
28. SHIMIZU, T
TAKIZAWA, T.
SHIBATA, S. Colonial types of strains of Staphylococcus aureus isolated from various animals in soft-agar-media.
Nat. Inst. Hlth. Quart. 5, 20-26 (1965)
29. SMITH, J.M.
DUBOS, R.J. The behavior of virulent and avirulent staphylococci in the tissues of normal mice.
J. Exp. Med. 110, 89-105 (1956)
30. TOMCSIK, J. Bacterial capsules and their relation to the cell wall.
Symp. Soc. Gen. Microbiol. 6, 41-67 (1956)

31. WILEY, B.B.
WONNACOTT, J.C.
Isolation and partial characterisation of a capsular material from Staphylococcus aureus.
J. Bact. 83, 1169-1176 (1962)
32. WILEY, B.B.
MAVERAKIS, N.H.
Virulent and avirulent encapsulated variants of Staphylococcus aureus.
J. Bact. 95, 998-1002 (1968)
33. WILEY, B.B.
Capsule size, coagulase production, and egg virulence among certain strains of Staphylococcus aureus.
Can. J. Microbiol. 14, 685-689 (1968)
34. YOSHIDA, K.
EKSTEDT, R.D.
Relation of mucoid growth of Staphylococcus aureus to clumping factor reaction, morphology in serum soft agar, and virulence.
J. Bact. 96, 902-908 (1968)
35. YOSHIDA, K.
SMITH, M.R.
NAITO, Y.
Biological and immunological properties of encapsulated strains of Staphylococcus aureus from human sources.
Inf. Imm. 2, 528-532 (1970)

Nach Abschluß meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. H. Blobel für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Hilfe sehr herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. J. Brückler für seine stets gewährte Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

- 1943 am 28.9. geboren in Oldersum/Ostfriesland
- 1950- Besuch der Volksschulen in Kettwig und
1954 Wülfrath
- 1954 Aufnahmeprüfung und Eintritt in das Städt.-
naturwissenschaftliche Gymnasium in Mettmann
- 1963 am 21.2. Ablegung der Reifeprüfung in Mettmann
- 1963- Ableistung des Wehrdienstes bei der Bundeswehr
1965
- 1965 Studium der Veterinärmedizin an der Justus
Liebig-Universität in Gießen
- 1970 6.12. Tierärztliche Prüfung
10.12. Bestallung als Tierarzt
- 1971 1.4. Beginn einer Dissertation am Institut
für Bakteriologie und Immunologie der Justus
Liebig-Universität
20.4. Anstellung als wiss. Hilfskraft

